

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Attorney Docket: 205,530

AF/1645 Ifw

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT: Rolondo WYSS, et al.
SERIAL NO.: 10/081,081
FILED: February 20, 2002
FOR: COMPLEX OF IMMUNOGLOBULINS AND POLYSACCHARIDES FOR ORAL
AND TRANSMUCOSAL ABSORPTION

Group: 1645

Examiner: Navarro, Albert Mark

Date: July 13, 2004

SUBMISSION OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT
UNDER TO 35 U.S.C. §119

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir or Madam:

Applicant, by its attorneys hereby submits to the USPTO a certified copy of the following application(s) which forms the basis of applicant's claim to priority.

Country: Italy

Application No.(s): MI2001A000347

Date(s) of Filing(s): February 21, 2001

Respectfully submitted,

By

Jay S. Cinnamon Reg. No. 24,156

ABELMAN, FRAYNE & SCHWAB
150 East 42nd Street
New York, New York 10017-5612
(212) 949-9022

"EXPRESS MAIL" Label No.: ET537590715US Date of
Deposited July 13, 2004 This correspondence is being
Deposited with the United States. Postal Service "Express Mail
Post Office to Addressee" service under 37 CFR § 1.10 on the
date indicated above and addressed to: Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N.

MI2001.A 000347

*Si dichiara che l'unita' copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*



Roma, il

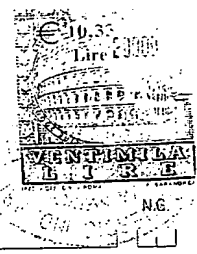
13 MAR. 2002

IL DIRIGENTE

Elena Marinelli
Sig.ra E. MARINELLI

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **GRISOTECH S.A.**
Residenza **SOAZZA CH** codice _____
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Dr. Diego Pallini ed altri** cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**
via **C.so di Porta Vittoria** n. **9** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) **A61K** gruppo/sottogruppo **39/00**

Complessi di immunoglobuline e polisaccaridi per assorbimento orale e trans-mucosale

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **WYSS Rolando** 3) **VOLPATO Ivo**
2) **BIZZINI Bernard** 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) **nessuna** _____
2) _____

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ **PROV** n. pag. **42** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare).....
Doc. 2) ☒ **PROV** n. tav. _____ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare).....
Doc. 3) ☒ **RIS** lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4) ☒ **RIS** designazione inventore
Doc. 5) ☒ **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) ☒ **RIS** autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) ☒ nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale lire

CINQUECENTOSESSANTACINQUEMILA.=

COMPILATO IL **21/02/2001**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Diego Pallini

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. MI

MILANO

codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2001A 000347

Reg. A.

L'anno millenovecento

DUEMILAUNO

il giorno

VENTUNO

del mese di

FEBBRAIO

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

00

paggi aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Giovanni Antonio

L'UFFICIALE ROGANTE

M. CORTONESI

D. TITOLO

Complessi di immunoglobuline e polisaccaridi per assorbimento orale e trans-mucosale

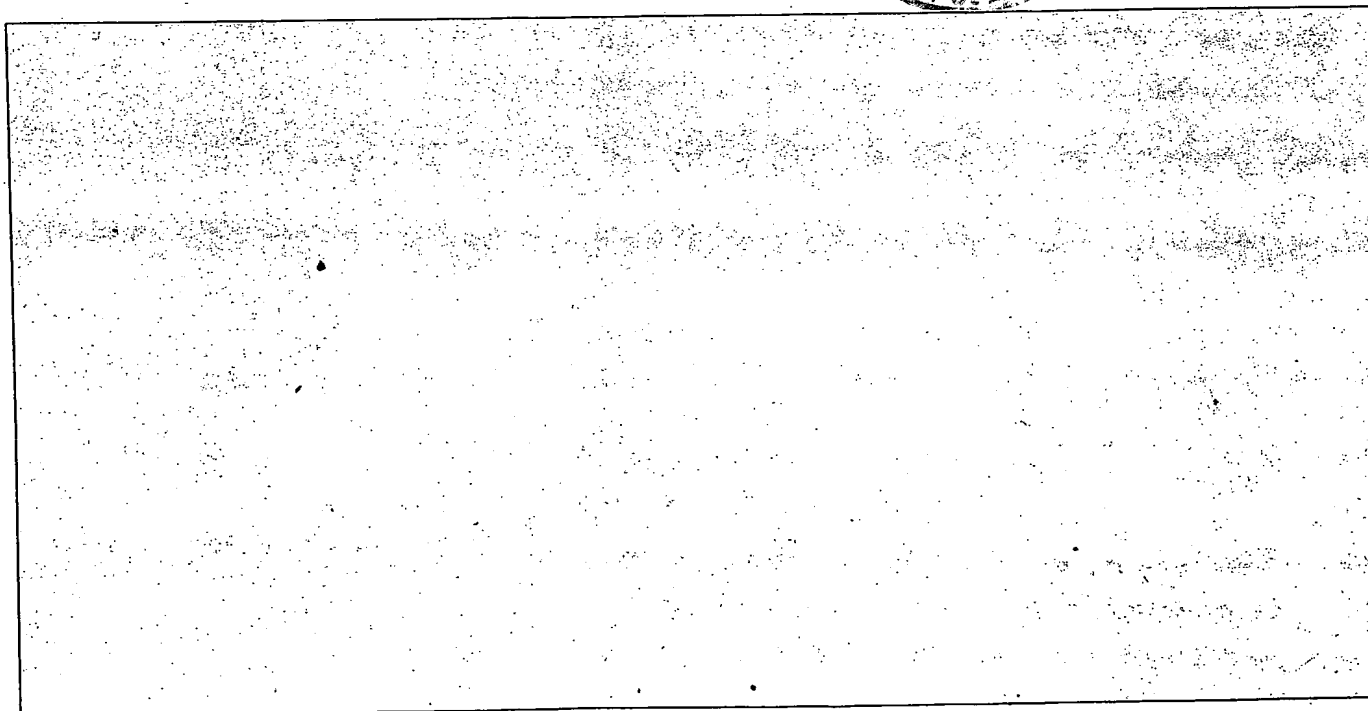
L. RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda complessi costituiti da immunoglobuline e polisaccaridi, per uso orale e transmucosale.

I polisaccaridi dei complessi dell'invenzione costituiscono un involucro che protegge e veicola le immunoglobuline facilitandone l'assorbimento nei distretti gastrico e mucosale. Le immunoglobuline hanno specificità diversa e dipendente dal tipo di effetto terapeutico necessario. Essi sono di utilizzo nell'immunoprofilassi passiva per la prevenzione o la terapia di infezioni da agenti patogeni quali virus, batteri, parassiti, oppure sono di utilizzo nella modulazione di equilibri biochimici endogeni, o nella detossificazione da agenti stupefacenti, farmaci, tossine.



M. DISEGNO



Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

Complessi di immunoglobuline e polisaccaridi per assorbimento orale e trans-mucosale

a nome di GRISOTECH S.A.

MI 2001A000347

con sede in SOAZZA (SVIZZERA)

Inventori designati : WYSS Rolando, BIZZINI Bernard, VOLPATO Ivo

CAMPO DELL'INVENZIONE

Il campo tecnico della presente invenzione è quello dell'immunoterapia.

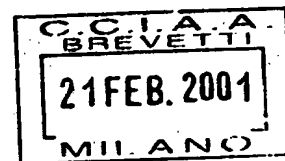
STATO DELL'ARTE

L'utilizzo di immunoglobuline in campo clinico è per ora limitato alla possibilità di somministrazione per via parenterale. Immunoglobuline per via parenterale vengono somministrate per conferire immunizzazione passiva dopo esposizione ad agenti patogeni, oppure in casi di detossificazione in seguito ad assunzione di sostanze stupefacenti (cocaina), di intossicazione da tossine naturali, oppure in casi di sovradosaggio di farmaci.

La somministrazione per via parenterale richiede l'intervento di personale medico e/o comunque specializzato.

L'uso di immunoglobuline per via orale o trans-mucosale, di più semplice assunzione, è rimasto finora un obiettivo di difficile attuazione per la presenza nei distretti gastrico e mucosale di enzimi proteolitici che inattiverebbero tali macromolecole proteiche.

L'assorbimento per via orale e transmucosale richiede infatti che le immunoglobuline vengano protette e veicolate fino al loro assorbimento



in circolo. Allo stato dell'arte risultano diversi studi mirati a consentire il passaggio attraverso le mucose di macromolecole di natura proteica e/o peptidica. Ad esempio è stato osservato che l'incorporamento in chitosano (in particolare cross-linkato) di strutture antigeniche e vaccini (ad es. la proteina gD2 del virus Herpes simplex, descritta in Ugozzoli et al. Immunology 1998, 93(4):563-71; l'emoagglutinina e la tossina di Bordetella pertussis, descritte in Jabbal-Gill et al., Vaccine 1998, 16(20): 2039-46) o di peptidi o ormoni preferibilmente a medio-basso peso molecolare (quali insulina e hGH, descritti in EP 0952822) può consentire l'assorbimento trans-mucosale.

In questi casi il chitosano viene generalmente reticolato e prodotto in microsfere di dimensioni adatte.

SOMMARIO

Costituiscono oggetto principale della presente invenzione i complessi di immunoglobuline e polisaccaridi per uso farmaceutico. Nei complessi secondo l'invenzione i polisaccaridi sono scelti tra: chitosano, chitosano di basso peso molecolare ed alto grado di deacetilazione, metilglicolchitosano, acido alginico, acido polimannuronico e loro sali o derivati. Nei complessi secondo l'invenzione le immunoglobuline ed i polisaccaridi sono associati mediante legami non-covalenti, preferibilmente ionici.

Le immunoglobuline dei complessi secondo l'invenzione sono immunoglobuline scelte tra IgG, IgA, o loro frammenti $F(ab')_2$ o $F(ab)$. Le immunoglobuline hanno specificità per agenti esogeni quali patogeni esterni, virus, batteri, parassiti o loro frammenti antigenici, oppure per

tossine di origine micotica, sostanze stupefacenti, farmaci; essi possono avere anche specificità per sostanze bioattive endogene, costituiti da ormoni, enzimi e proenzimi, peptidi bioattivi, metaboliti, precursori fisiologici. Essi sono di utilizzo sia nel caso in cui sia utile modificare gli equilibri endogeni di tali sostanze in situazioni patologiche così come in quelle normofunzionali. Immunoglobuline aventi specificità diverse possono inoltre essere associate in un unico complesso per ottenere un effetto terapeutico unico o sinergico.

Particolarmente preferiti secondo la presente invenzione sono i complessi dove le immunoglobuline hanno specificità per: tossine di origine micotica, o per farmaci quali: monensina, corticosteroidi, antibiotici etc, o per virus, o per batteri quali: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thipy*, *s. enteriditis* o per le loro componenti antigeniche, che costituiscono casi classici di immunoprofilassi passiva. Altrettanto preferiti sono i complessi dove le immunoglobuline hanno specificità per ormoni quali: gonadotropina corionica, paratormone, glucagone o per il proenzima endogeno protrombina ed inoltre per sostanze stupefacenti quali: cocaina, eroina, acido lisergico e i loro sali e derivati.

In tali complessi, i polisaccaridi, costituendo un involucro protettivo intorno alla immunoglobuline, ne consentono l'assorbimento per via orale e transmucosale, permettendone un utilizzo precluso dalla sola somministrazione parenterale.

Costituisce inoltre oggetto della presente invenzione l'uso dei complessi di polisaccaridi ed immunoglobuline per la preparazione di farmaci detossificanti, di farmaci per il trattamento della sindrome da

sovradosaggio da sostanze stupefacenti, di farmaci antiulcera, di farmaci per il trattamento di problemi dell'accrescimento.

Costituiscono inoltre oggetto della presente invenzione le composizioni farmaceutiche contenenti quali principio attivo i complessi secondo l'invenzione, in associazione o meno con opportuni eccipienti, adiuvanti, di cui il preferito è rappresentato dalla frazione delipidata di C. granulosum.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Costituiscono oggetto principale della presente invenzione complessi di immunoglobuline incorporate in polimeri polisaccaridici per l'assorbimento di macromolecole proteiche aventi peso molecolare compreso tra 50 kD (frammenti F(ab)), 100 kD (frammenti F(ab')₂) e 150 kD (IgG) per via orale e/o transmucosale.

L'assorbimento per via orale o per via mucosale presenta, rispetto alla somministrazione per via parenterale principalmente il vantaggio della semplicità: infatti tale tipo di somministrazione non richiede l'intervento di personale medico e/o comunque specializzato..

E' stato osservato dagli autori della presente invenzione, e ne costituisce il principale oggetto, che l'assorbimento di macromolecole proteiche per via orale e/o transmucosale è possibile utilizzando diversi derivati del chitosano e/o dell'acido alginico, senza limitazioni di peso molecolare, quali agenti incorporanti tali macromolecole.

La possibilità di rendere biodisponibili (assorbibili) le immunoglobuline per via orale e trans-mucosa (perlinguare, enterica, nasale, vaginale, rettale), apre una serie di nuove applicazioni nell'impiego farmacologico



di queste macromolecole.

Costituiscono pertanto oggetto della presente invenzione i complessi costituiti da immunoglobuline incorporate in polisaccaridi, dove i polisaccaridi rivestono esternamente le immunoglobuline, veicolandole e proteggendone la struttura proteica, e consentendone quindi l'assorbimento per via orale e transmucosale in forma attiva. Pertanto nei complessi secondo l'invenzione i polisaccaridi e le immunoglobuline non sono legate da legami covalenti, ma piuttosto da interazioni di tipo aspecifico, forze di van der Waals o legami ionici.

L'assorbimento per via orale o trans-mucosale presenta ulteriori vantaggi rispetto a quello per via parenterale. Nel caso specifico di proteine eterologhe quali le immunoglobuline il primo tipo di assorbimento, più lento e graduale, consente di controllare maggiormente il dosaggio e la distribuzione in circolo delle stesse senza alterarne l'efficacia. Infatti quando non è possibile disporre di immunoglobuline autologhe o nei trattamenti ripetuti, l'uso parenterale, accompagnato da un rapido innalzamento del livello di Ig eterologhe circolanti, può provocare fenomeni di immuno-incompatibilità, o addirittura shock anafilattico, precludendo i trattamenti ripetuti a medio-lungo termine. L'assorbimento orale o transmucosale dei complessi di immunoglobuline secondo la presente invenzione consentendo invece una entrata più lenta e graduale dell'antigene in circolo, ne ottimizza le condizioni di interazione con il sistema immunitario, riduce l'immunoreattività verso la proteina eterologa e permette di razionalizzare nel tempo il trattamento mantenendo costanti i livelli del

prodotto circolante, consentendo globalmente una migliore distribuzione delle immunoglobuline in circolo

L'incorporazione di Ig in polisaccaridi è effettuata utilizzando preparazioni di polisaccaridi con caratteristiche chimico-fisiche diverse e a diverso grado di derivatizzazione. I polisaccaridi sono preferibilmente scelti tra: chitosano e alginato, e loro derivati, quali ad esempio, chitosano di basso peso molecolare (150.000), chitosano di medio peso molecolare (400.000) e ad alto grado di deacetilazione, glicolchitosano, metilglicolchitosano, Protasan™. Particolarmente preferiti sono il metilglicolchitosano, il chitosano di basso peso molecolare ed alto grado di deacetilazione, e l'acido polimannuronico (MW 5-10 kD), ottenuto ad esempio mediante idrolisi enzimatica dell'acido alginico con l'enzima alginato-liase, ed i loro derivati. Tali polisaccaridi o i loro derivati sono scelti tra quelli in grado di formare intorno alla struttura da incorporare (nel caso specifico immunoglobuline) una "patina" polimerica resistente all'attività enzimatica ed alle variazioni chimico-fisiche dell'apparato digerente, e consentono inoltre la capacità di direzionare l'incorporato verso le cellule mucosali, agevolandone l'assorbimento.

I polisaccaridi utilizzati per l'incorporazione di immunoglobuline sono preferibilmente non reticolati (cross-linked). La mancanza di reticolazione rappresenta un ulteriore vantaggio dei complessi secondo l'invenzione, in quanto il procedimento per la loro preparazione è più semplice, ed il prodotto finale non contiene i residui della reticolazione chimica, potenzialmente tossici.

Caratteristica dei complessi secondo la presente invenzione è che i

polisaccaridi rivestono le immunoglobuline senza essere covalentemente legati ad esse, ma formando una sorta di involucro superficiale anche in forma di gel, come ad esempio nel caso di acido alginico.

Le immunoglobuline incorporate nei polisaccaridi sono IgG o IgA, o loro frammenti $F(ab')_2$ o $F(ab)$. Preferibilmente sono IgG o loro frammenti $F(ab')_2$ o $F(ab)$ o frammenti biologicamente attivi derivati ad esempio mediante il clonaggio delle catene leggere delle Ig di cui sopra, quali scFv. Le IgG sono preparate secondo metodi noti nello stato dell'arte, ad esempio mediante immunizzazione di mammiferi, quali topi conigli etc. come immunoglobuline policlonali (Johnstone A. & Thorpe, in "Immunochemistry in Practice", 1982, 27-31, Blackwell Sci. Publ. Oxford) oppure secondo la tecnica descritta ad esempio in Kohler G. & Milstein C., Nature 256:495-497, come anticorpi monoclonali. Particolarmente preferiti sono i complessi contenenti anticorpi prodotti in coniglio, pecora o cavallo. I metodi per la preparazione dei frammenti $F(ab)$ o $F(ab')_2$ sono noti e descritti ad esempio in WO 97/49732. Le immunoglobuline possono inoltre essere di origine commerciale.

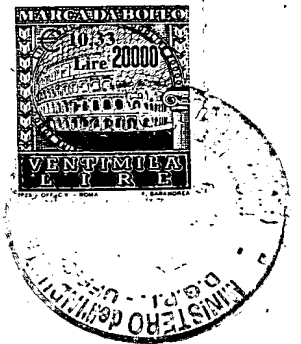
Gli anticorpi utilizzati per la preparazione dei complessi secondo l'invenzione hanno specificità diversa, scelta in relazione all'effetto terapeutico desiderato. E' comunque inteso che, oltre alle particolari applicazioni ricordate nella presente descrizione, qualsiasi complesso di immunoglobuline e polisaccaridi, in particolare chitosano e alginato, per uso orale e/o transmucosale, rientra nell'ambito della presente invenzione. Immunoglobuline aventi specificità diverse possono inoltre

essere combinate in un unico complesso, al fine di ottenere un effetto terapeutico unico o sinergico.

Secondo una particolare applicazione in campo infettivologico, i complessi dell'invenzione consentono di conservare se non migliorare, le possibilità di impiego delle immunoglobuline nei casi in cui è utile l'immunizzazione passiva, cioè quando l'antigene infettivo è già presente nell'organismo ed è comunque utile avere immunoprotezione immediata fino al momento dello sviluppo di anticorpi endogeni consequenziali alla vaccinazione attiva.

Una ulteriore ed innovativa applicazione dei complessi dell'invenzione è rappresentata dalla possibilità di utilizzo del trattamento immunoglobulinico nella regolazione degli equilibri biofunzionali fisiologici del soggetto ottenendo, come risultato, delle variazioni metaboliche atte a correggere lo stato funzionale dell'organismo. Viene inoltre consentita la possibilità di correggere gli squilibri funzionali e metabolici conseguenti a degenerazioni organiche di natura diversa e nell'antagonismo dell'accumulo di farmaci e sostanze di abuso e nella neutralizzazione degli effetti tossici derivanti dal loro utilizzo.

In campo infettivologico, i complessi possono essere costituiti da immunoglobuline aventi specificità per agenti quali virus, ad esempio: Herpes simplex, citomegalovirus (CMV), virus della varicella, della rosolia, virus sinciziale, virus respiratorio, dell'influenza, di Epstein-Barr o per loro componenti antigeniche, oppure quali batteri: ad esempio *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thipy*, *S. paratiphy*, *S. thiphymurium*, *S. choleraensis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* o



Shigella etc., oppure quali miceti, ad esempio Candida albicans, oppure quali parassiti ad esempio il Toxoplasma gondii; in tutti questi casi ed in altri ancora dove sia necessario procedere all'immunizzazione passiva per infezione in essere o a rischio imminente. Particolarmente preferiti sono i complessi contenenti IgG anti-Listeria monocytogenes e anti-Salmonella enteritidis.

Sono inoltre utilizzate immunoglobuline specifiche per tossine di origine micotica quali l'ocratossina e aflatossina nel caso ad esempio di intossicazioni alimentari. Sindromi da intossicazione sono conseguenti anche all'abuso di sostanze stupefacenti (quali ad esempio cocaina, LSD eroina) in seguito ad assuefazione o a sovradosaggio di farmaci e ormoni. Particolarmente nel settore zootecnico, può essere necessario detossificare gli animali da farmaci impiegati per l'incremento della crescita (progestinici, estrogeni, tireostatici, corticosteroidi, simpaticomimetici) o nella prevenzione e/o terapia delle malattie infettive (antibiotici come ossitetraciclina, ampicillina o fungistatici o coccidiostatici quali la monensina), al fine di garantire la decontaminazione del prodotto finale (carne, latte, uova). Nei casi di intossicazione, infezione, o comunque stati patologici mediati da sostanze o agenti esogeni, sono particolarmente preferiti i complessi costituiti da polisaccaridi, come descritti in precedenza, ed immunoglobuline con specificità per: ocratossina, aflatossina e progesterone, Listeria monocytogenes e Salmonella enteritidis, per farmaci quali monensina e per sostanze stupefacenti, in particolare per la cocaina. Nei casi di utilizzo dei complessi secondo la presente

invenzione per immunizzazione passiva, l'effetto può essere potenziato dalla contemporanea somministrazione di immunomodulatori incorporati nelle stesse strutture polisaccaridiche utilizzate per le immunoglobuline. Tali immunomodulatori sono derivati dalla frazione insolubile costituita da glicoproteina e peptidoglicano di *Corynebacterium granulosum* e sono caratterizzati da una significativa attività immunostimolante ed adiuvante di tipo aspecifico. La contemporanea somministrazione di complessi contenente una classe di immunoglobuline diretta verso un determinato antigene microbico contemporaneamente o successivamente alla somministrazione di un immunomodulatore aspecifico, consente di attivare le cellule coinvolte nella difesa non specifica dell'organismo, svolgendo inoltre un effetto sinergico nel processo di complessazione (formazione degli immunocomplessi circolanti) e di fagocitosi dell'antigene in combinazione con le immunoglobuline specifiche.

I complessi costituiti da polisaccaridi e dalla frazione delipidata di *Corynebacterium granulosum* sono prodotti analogamente ai complessi contenenti immunoglobuline. La frazione delipidata di *Corynebacterium granulosum* viene preparata facendo crescere i batteri in condizioni di stretta anaerobiosi in terreni e condizioni di temperatura, agitazione e tempi noti nello stato dell'arte, quali Bactonutrient broth dehydrated e yeast extract (Difco), in presenza di NaCl e glucosio. I batteri vengono cresciuti per circa 30 ore, inattivati mediante trattamento ad alta temperatura, ad esempio 30' a 60°C e quindi concentrati ad es. mediante centrifugazione. La massa batterica viene quindi sottoposta a

delipidazione mediante una serie di estrazioni in solventi organici, quali ad esempio 1 estrazione in acetone di circa 24 ore, seguita da una estrazione in cloroformio (24 ore) e quindi estrazione in miscela di metanolo-etere in rapporto 1:2 (vol:vol). Il sedimento di batteri delipidati viene quindi sottoposto a rottura meccanica mediante omogeneizzatore waring Blendor e quindi centrifugati a bassa velocità. Il surnatante, costituito da batteri rotti, viene ulteriormente centrifugato ad alta velocità (ad es. 10.000 rpm, per 15-30'). Il sedimento ottenuto in quest'ultimo passaggio rappresenta la frazione particellare BVV.

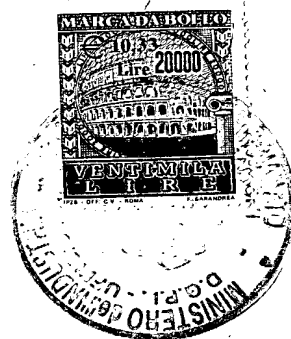
I complessi secondo l'invenzione, assorbibili per via orale e/o transmucosale, sono utilizzati non solo quando sia necessario ridurre il livello ematico di un agente esterno (come nel caso di agenti infettivi, droghe, farmaci, tossine etc), ma anche quando si vogliano regolare i livelli endogeni di ormoni, enzimi e proenzimi, peptidi bioattivi precursori e/o metaboliti di varia natura prodotti dallo stesso organismo o comunque sostanze endogene coinvolte nella biochimica sia cellulare che dell'organismo intero. Tale regolazione può essere richiesta sia per correggere situazioni patologiche indotte da alterazione degli equilibri endogeni di tali sostanze, in particolare malattie croniche, cronicizzanti o degenerative, che per variare l'equilibrio biochimico di soggetti normofunzionali ad esempio: accrescimento negli animali, sforzo fisico negli atleti, induzione o blocco della gravidanza, aumento della soglia di attenzione, eliminazione di metaboliti derivanti da processi degenerativi, etc.

In questi casi l'assorbimento lento e graduale delle immunoglobuline per

la via orale o transmucoale, reso possibile dalla veicolazione mediata da polisaccaridi secondo la presente invenzione, consente di ipotizzare interventi terapeutici preclusi dal solo uso parenterale.

I complessi secondo la presente invenzione sono utilizzati in quest'ultimo caso per la preparazione di farmaci aventi come effetto il ri-bilanciamento molecolare di livelli endogeni di ormoni o enzimi o proenzimi o peptidi bioattivi coinvolti nella regolazione di funzioni organiche. Ad esempio, nel caso in cui sia necessario variare i livelli di calcio endogeno, i complessi secondo l'invenzione conterranno anticorpi, o loro frammenti, aventi specificità per la calcitonina o per il paratormone, entrambi coinvolti nell'omeostasi del calcio. Nel caso in cui invece si voglia intervenire nei problemi di accumulo di grassi, ad esempio nella patogenesi dell'obesità, le immunoglobuline verranno scelte tra quelle aventi specificità ad esempio per le lipasi. In altri casi legati ad un disequilibrio del metabolismo degli amino-zuccheri, le Ig saranno scelte tra quelle aventi specificità per l'enzima β -D-N-acetil-glucosaminidasi.

Particolarmente preferiti nel campo della regolazione dei livelli di sostanze endogene, sono i complessi contenenti immunoglobuline o loro frammenti con specificità per: somatostatina, glucagone, colecistochinina, ormone della crescita (GH) nei problemi legati all'accrescimento; calcitonina e paratormone nei problemi legati all'omeostasi del calcio. Altrettanto preferiti sono i complessi contenenti anticorpi, o loro frammenti, per la protrombina (PTT) come agenti antitrombotici, oppure per la gonadotropina corionica (ChCG) come



farmaci antigravidanza, oppure per la pentagastrina come farmaci anti-ulcera.

Costituisce inoltre oggetto della presente invenzione l'impiego dei complessi di immunoglobuline e polisaccaridi per la preparazione di farmaci ad assorbimento orale e/o transmucosale detossificanti, antiulcera, per il trattamento delle trombosi, per il trattamento dell'obesità; nonché il loro impiego per la preparazione di farmaci per il trattamento dei sovradosaggi nelle tossicodipendenze, in particolare quelle indotte dall'assunzione di cocaina, di eroina e di acido lisergico (LSD).

I complessi secondo la presente invenzione sono costituiti anche da immunoglobuline aventi specificità diversa, al fine di ottenere complessi plurifunzionali, oppure tali da contenere anche l'immunoadiuvante, quale il BVV come descritto in precedenza.

L'impiego dei complessi secondo la presente invenzione risulta particolarmente utile in campo zootecnico per la preparazione di additivi alimentari, in grado ad esempio di detossificare gli animali destinati alla produzione di carne o di latte.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è costituito da composizioni per uso orale contenenti quali principio attivo i complessi di immunoglobuline e polisaccaridi in combinazione con opportuni adiuvanti ed eccipienti, quali ad esempio quelli impiegati nello stato dell'arte per la preparazione di granulati alimentari per uso umano e zootecnico (amido di mais etc.).

Ulteriore oggetto della presente invenzione è costituito da composizioni



per uso trans-mucosale ad esempio per via perilinguale, enterica, nasale, vaginale o rettale, contenenti quale principio attivo i complessi secondo l'invenzione, anche costituiti da immunoglobuline aventi una solo o più specificità, in combinazione con opportuni eccipienti, diluenti o solventi; costituiscono inoltre oggetto dell'invenzione le composizioni dove gli adiuvanti sono costituiti dall'immunomodulatore BVV, sia singolarmente presente nel complesso che in combinazione con le immunoglobuline.

Rappresenta ulteriore oggetto della presente invenzione il procedimento per la preparazione dei complessi di immunoglobuline e polisaccaridi, in particolare acido alginico, acido polimannuronico, metilglicolchitosano, chitosano di basso peso molecolare ed alto grado di deacetilazione, che comprende la miscelazione di una soluzione concentrata di immunoglobuline (5-50 mg/ml) in Na_2SO_4 , portata ad una temperatura compresa tra 50 e 60°C con una soluzione contenente il polisaccaride in concentrazione compresa tra 0.1 e 10% in peso/volume e miscelando mediante agitazione meccanica alla massima velocità.

PARTE SPERIMENTALE

Esempio 1. Preparazione degli anticorpi (immunoglobuline).

Preparazione degli immunogeni

Gli immunogeni sono stati preparati mediante coniugazione con KLH, o con BSA o ovalbumina, oppure mediante fissazione con glutaraldeide.

Gli immunogeni batterici (*Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*) sono stati preparati mediante inattivazione del microorganismo ad esempio con formalina ed acetone.

Sono stati coniugati con KLH gli antigeni: Colesterolo-KLH, Pentagastrina-KLH, colecistochinina-KHL, calcitonina-KLH (calcitonina di salmone), glucagone, la monensina. L'immunogeno della ChG (gonadotropina corionica) è stato coniugato con BSA a dare: BSA-ChG (Catena β), così come l'antigene paratormone bovino (frammento 1-34). L'immunogeno della protrombina e della somatostatina sono stati preparato mediante trattamento con glutaraldeide.

La preparazione dell'immunogeno o vaccino di *Listeria monocytogenes* è stata effettuata mediante aggiunta di formalina alla sospensione di crescita del microorganismo fino alla concentrazione finale dello 0.5%.

La coltura del microorganismo è stata effettuata per 36 ore a 37°C in brodo nutriente Difco, e incubazione per 12 ore a temperatura ambiente.

I batteri uccisi in formalina vengono lavati 3 volte e risospesi in PBS alla concentrazione dell' 1% (v/v). La preparazione dell'immunogeno (vaccino di *Salmonella enteritidis*) è stata effettuata mediante estrazione con acetone per 12 ore a temperatura ambiente e successivi (tre) lavaggi con soluzione fisiologica sterile.

Immunizzazione e produzione degli anticorpi.

Gli immunogeni descritti nel paragrafo precedente sono stati utilizzati per la preparazione degli anticorpi preparati in coniglio mediante lo schema classico di immunizzazione riportato in Johnstone A. & Thorpe, in "Immunochemistry in Practice", 1982, 27-31, Blackwell Sci. Publ. Oxford. Lo schema di trattamento per la produzione di detti anticorpi è stato il medesimo per tutti gli immunogeni. Gli anticorpi sono stati purificati mediante precipitazione in soluzione satura al 50% di ammonio solfato,

secondo metodi noti nello stato dell'arte quali quelli descritti in WO 97/49732. Anche i frammenti anticorpali $F(ab')_2$ e $F(ab)$ sono stati preparati come descritto in WO 97/49732, secondo metodi noti nello stato dell'arte.

Esempio 2. Incorporazione di immunoglobuline in polisaccaridi (chitosano e alginato).

Incorporazione in chitosano

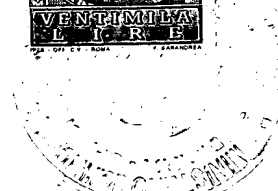
Per l'incorporazione delle immunoglobuline sono state utilizzate preparazioni di chitosano con diverse caratteristiche, ad esempio: chitosano di basso peso molecolare (150.000), chitosano di medio peso molecolare (400.000) ad alto grado di deacetilazione, glicolchitosano, metilglicolchitosano, Protasan™.

Il chitosano (MW 750kD, Fluka 22742) venne sciolto allo 0.2%-1% in tampone acetato 0.025 M, pH 5.7. La soluzione di IgG purificate (21 g/L) venne sciolta in Na_2SO_4 0.05M (10 mg in 2.5 ml). Ciascuna soluzione fu riscaldata a bagnomaria a 55°C. 2.5 ml della soluzione di chitosano vennero aggiunti per 2.5 ml di soluzione di IgG e la miscela agitata con vortex alla velocità massima per 20-60 secondi.

Incorporazione in alginato.

Alla preparazione di IgG in PBS (10 mg in 50 ml) venne aggiunto 1 volume uguale di alginato di sodio (Fluka - 71238) bassa viscosità dal 1 al 5% in PBS. La miscela venne agitata su vortex alla velocità massima per 30-120 secondi.

Esempio 3. Preparazione del complesso adiuvante BVV-polisaccaridi



[Handwritten signature]

Preparazione della frazione BVV da *Corynebacterium granulosum*.

L'immunomodulatore BVV che è una frazione particellare di *Corynebacterium*, fu ottenuto a partire da una coltura del microorganismo. La coltura venne inattivata per riscaldamento (30 minuti) a 60°C. La coltura raffreddata a temperatura ambiente venne centrifugata ed i batteri raccolti. La massa batterica fu lavata mediante risospensione in fisiologica e centrifugazione. Il lavaggio venne ripetuto ancora una volta ed i batteri vennero delipidati mediante estrazione con solventi organici e rotti con waring-blendor. I batteri non rotti furono eliminati per centrifugazione a bassa velocità per 10 minuti. Il surnatante venne quindi sottoposto a centrifugazione ad alta velocità (10.000 rpm, 30') per raccogliere i pezzi di batteri. Questo sedimento, costituito prevalentemente da glicoproteine e peptidoglicani rappresenta la frazione particellare denominata BVV.

Preparazione dei complessi dell'adiuvante BVV da *Corynebacterium* in chitosano.

Una sospensione particellare insolubile da *C. granulosum* (BVV) con concentrazione da 200 a 2000 µg/ml in Na₂SO₄ 50 mM, venne riscaldata a bagnomaria a 55°C, e venne aggiunto un volume uguale di soluzione di chitosano al 0.2-4% in tampone acetato 25 mM, pH 5.7. La miscela venne riscaldata a 55°C ed agitata sul vortex alla velocità massima per 30-120 secondi.

Preparazione dei complessi dell'adiuvante BVV da *Corynebacterium* in alginato.

A un volume di sospensione di BVV da 200 a 2000 µg per ml in PBS si

aggiunge un volume di soluzione di alginato di sodio a bassa viscosità dal 1 al 5% in PBS. La miscela venne agitata sul vortex alla velocità massima per 30-120 secondi.

Esempio 4. Verifica dell'assorbimento delle IgG specifiche dopo somministrazione orale dei complessi IgG-alginato e IgG-chitosano.

I complessi polisaccaridici contenenti IgG specifiche, in sospensione di gomma arabica all'1%, vennero somministrati per insondamento gastrico nel volume costante di 1 ml ed in concentrazioni variabili da 10 a 50 mg/Kg di immunoglobulina specifica.

L'assorbimento delle IgG somministrate oralmente venne quindi verificato mediante prelievo del sangue e dosaggio delle stesse IgG specifiche nel siero mediante metodo immunoenzimatico ELISA.

Gli esperimenti furono condotti su ratti Wistar del peso di 200 gr, divisi in 3 gruppi di 20 animali ciascuno, così trattati:

1° gruppo - animali di controllo, trattati con solo veicolo;

2° gruppo - animali trattati con IgG specifiche incorporate in chitosano;

3° gruppo - animali trattati con IgG specifiche incorporate in alginato.

Gli esperimenti furono condotti per tutte le IgG specifiche per i vari immunogeni citati nell'esempio 1, utilizzando le medesime modalità sperimentali.

Il prelievo di sangue fu effettuato per puntura intracardiaca a distanza di 3 e 6 ore dall'insondamento. Il siero fu ottenuto per centrifugazione del sangue a 3000 rpm, per 15 minuti.

Protocollo del metodo ELISA

Gli antigeni, così come utilizzati per l'immunizzazione e preparati come descritto nell'esempio 1, vennero adesi ai pozzetti di una micropiastra mediante adsorbimento di 125 μ L di una soluzione contenente 4 μ g/ml di immunogeno in PBS (phosphate saline buffer 0.1 M pH 7.4) a 37°C per 3 ore.

A ciascun pozzetto vennero aggiunti 100 μ L di siero animale, diluito in PBS (1:5, 1:20, 1:40, 1:80) che furono lasciati incubare per 30' a 37°C, per permettere l'adesione delle IgG specifiche all'antigene sulla micropiastra. Le IgG non legate furono eliminate mediante lavaggio con soluzione fisiologica. La rilevazione degli anticorpi specifici (IgG somministrate) venne effettuata mediante aggiunta successiva al pozzetto di 100 μ L di una soluzione di una anti-immunoglobulina di coniglio coniugata ad un enzima rivelatore (anti-rabbit IgG coniugato a perossidasi; SIGMA A 8275) lasciando a contatto per 30 minuti a 37°C. L'eccesso di coniugato non legato, fu eliminato mediante lavaggio e venne aggiunto il cromogeno (OPD – sigma 6662), leggendo quindi l'intensità di colore a 492 nm. Questa è direttamente proporzionale alla concentrazione di immunoglobuline specifiche somministrate per bocca.

I risultati in D.O. ottenuti per i diversi complessi di immunoglobuline specifiche somministrate presenti nel siero, generalmente a 3 ore dalla somministrazione, sono riportati nelle tabelle da 1 a 13.

Tabella 1. Rilevazione delle IgG anti-ocratossina presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA

IgG anti-ocratossina		Valori di D.O. medi			
		Diluizioni del siero			
Gruppo n.	trattamento	1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.031	-	-	-
2	Veicolo (controlli)	0.368	0.238	0.105	0.054
3	IgG in chitosano	0.891	0.880	0.608	0.460
4	IgG in alginato	0.955	0.670	0.410	0.360

Tabella 2. Rilevazione delle IgG anti-aflatossina presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

Ig anti-aflatossina		Valori di D.O. medi			
		Diluizioni del siero			
Gruppo n.	trattamento	1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.045			
2	Veicolo (controlli)	0.304	0.250	0.235	0.240
3	IgG in chitosano	0.940	0.718	0.530	0.375
4	IgG in alginato	0.820	0.680	0.440	0.270



✓

Tabella 3. Rilevazione delle IgG anti-progesterone presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione; mediante metodo ELISA

Ig anti-progesterone	Valori di D.O. medi				
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.024			
2	Veicolo (controlli)	0.220	0.200	0.160	0.160
3	IgG in chitosano	1.050	0.930	0.750	0.560
4	IgG in alginato	1.000	0.820	0.700	0.520

Tabella 4. Rilevazione delle IgG anti-Listeria monocytogenes presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti-L. monocytogenes	Valori di D.O. medi				
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.030			
2	Veicolo (controlli)	0.270	0.230	0.200	0.190
3	IgG in chitosano	1.090	0.930	0.870	0.650
4	IgG in alginato	1.000	0.880	0.750	0.580

Tabella 5. Rilevazione delle IgG anti-Salmonella enteritidis presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA

IgG anti-S. enteritidis	Valori di D.O. medi				
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.025			
2	Veicolo (controlli)	0.290	0.290	0.220	0.200
3	IgG in chitosano	0.850	0.740	0.620	0.480
4	IgG in alginato	0.940	0.870	0.730	0.560

Tabella 6. Rilevazione delle IgG anti-glucagone presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti- Glucagone	Valori di D.O. medi				
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.035			
2	Veicolo (controlli)	0.310	0.280	0.250	0.230
3	IgG in chitosano	0.770	0.680	0.540	0.430
4	IgG in alginato	0.880	0.740	0.620	0.490

Tabella 7. Rilevazione delle IgG anti-colecistochinina presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti-colecistochinina	Valori di D.O. medi				
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.040			
2	Veicolo (controlli)	0.200	0.200	0.170	0.140
3	IgG in chitosano	1.040	0.900	0.790	0.630
4	IgG in alginato	1.100	0.950	0.800	0.660

Tabella 8. Rilevazione delle IgG anti-paratormone presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti-paratormone	Valori di D.O. medi				
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.025			
2	Veicolo (controlli)	0.310	0.280	0.270	0.230
3	IgG in chitosano	1.020	0.900	0.780	0.590
4	IgG in alginato	1.080	0.750	0.630	0.490

Tabella 9. Rilevazione delle IgG anti-protrombina presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti-protrombina	Valori di D.O. medi				
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.025			
2	Veicolo (controlli)	0.200	0.150	0.130	0.130
3	IgG in chitosano	0.800	0.660	0.530	0.390
4	IgG in alginato	0.740	0.640	0.500	0.370

Tabella 10. Rilevazione delle IgG anti-gonadotropina corionica (ChG) presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti-ChG	Valori di D.O. medi				
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.030			
2	Veicolo (controlli)	0.300	0.270	0.240	0.190
3	Trattati con IgG in chitosano	0.950	0.800	0.630	0.420
4	Trattati con IgG in alginato	0.900	0.790	0.600	0.350



Tabella 11. Rilevazione delle IgG anti-pentagastrina presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti-pentagastrina		Valori di D.O. medi			
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.020			
2	Veicolo (controlli)	0.280	0.250	0.200	0.160
3	IgG in chitosano	1.180	1.090	0.970	0.830
4	IgG in alginato	1.050	0.970	0.730	0.580

Tabella 12 Rilevazione delle IgG anti-cocaina presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti-cocaina		Valori di D.O. medi			
Gruppo n.	trattamento	Diluizioni del siero			
		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.26			
2	Veicolo (controlli)	0.300	0.270	0.240	0.200
3	IgG in chitosano	0.820	0.700	0.630	0.500
4	IgG in alginato	0.760	0.620	0.550	0.390

Tabella 13. Rilevazione delle IgG anti-monensina presenti in circolo dopo somministrazione per via orale dei complessi secondo l'invenzione, mediante metodo ELISA.

IgG anti-monensina	Valori di D.O. medi				
	trattamento	Diluizioni del siero			
Gruppo n.		1:5	1:20	1:40	1:80
1	Bianco	0.30			
2	Veicolo (controlli)	0.270	0.240	0.230	0.200
3	IgG in chitosano	1.040	0.930	0.840	0.730
4	IgG in alginato	1.000	0.925	0.845	0.700

I dati raccolti nelle tabelle da 1 a 13 indicano che i complessi secondo l'invenzione vengono assorbiti per via orale e che le immunoglobuline sono rilasciate in circolo; tali immunoglobuline sono attive, come dimostrato dalla capacità specifica di riconoscimento dell'antigene, valutata secondo ELISA. In particolare sia i complessi costituiti da alginato che quelli in chitosano sono ugualmente attivi.

Esempio 5. Valutazione dell'attività biologica dei complessi Ig-polisaccaridi.

L'attività biologica delle immunoglobuline somministrate per via orale come complessi è stata valutata sul ratto in diverse condizioni sperimentali in funzione dell'effetto che le immunoglobuline specifiche svolgono: eliminazione di residui tossici dall'organismo, variazione degli equilibri biochimici funzionali normali, antagonismo dei fattori di rischio patogenetici.

Prova di detossificazione dell'animale trattato con IgG anti-ocratossina.

In questo esperimento, al fine di verificare la capacità di IgG anti-ocratossina orale di eliminare la tossina presente in circolo si è proceduto all'intossicazione dell'animale mediante somministrazione parenterale della stessa. In considerazione della breve emivita della tossina e dei tempi di assorbimento dei complessi somministrati per via orale, il detossicante (complessi con IgG anti-ocratossina) fu somministrato all'animale prima dell'intossicazione. Il dosaggio di IgG detossificanti fu stabilito sulla base di un esperimento preliminare di intossicazione effettuato per valutare l'emivita ed i tassi ematici raggiunti dalla tossina *in vivo* in animali di peso corrispondente. Il dosaggio di IgG fu calcolato tenendo presente che 1 mole di IgG può legare 2 moli di tossina in condizioni ottimali.

Gli esperimenti preliminari sono stati condotti sul ratto maschio dal peso di 200 ± 10 gr suddiviso in gruppi da 20 unità, seguendo il seguente modello sperimentale: ad un gruppo di animali veniva somministrata ocratossina per via sottocutanea, nella dose di 200 µg/kg; dopo 3, 6, 9 ore veniva prelevato il sangue per puntura intracardiaca e centrifugato a 3000 rpm, per 15 minuti, per la separazione dei sieri. I campioni di sieri venivano riuniti e su questi si procedeva alla determinazione dei tassi ematici di ocratossina con metodologie HPLC (M. Ospital, J.M. Carabeie, A. M. Betbeder, C. Tricard, E. Creppy e B. Medina, L'Ochratoxine, A dans les vins, Revue Francaise d'Enologie, mar/apr. 1998, n. 169).

Una volta stabiliti i livelli ematici e la velocità di eliminazione della tossina dal sangue un gruppo di 20 ratti, dello stesso peso medio del precedente, veniva trattato per via orale con IgG anti-ocratossina incorporata in chitosano ad una dose molare 5 volte superiore al numero di millimoli di tossina dosate nel sangue; le IgG incorporate venivano somministrate in sospensione di gomma arabica al 2%. Dopo 1.5 ore veniva iniettata agli animali per via sottocutanea, ocratossina sempre alla dose di 200 µg/kg.

A distanza di 3, 6, 9 ore da tale somministrazione venivano eseguiti i prelievi di sangue e separati i sieri con le stesse modalità. Sui campioni di siero riuniti veniva eseguita l'analisi del contenuto di ocratossina.

Nella tabella è riportato l'abbassamento percentuale del contenuto ematico di ocratossina negli animali pretrattati con IgG incorporati con chitosano rispetto agli animali che hanno ricevuto solo la tossina.

Tabella 14. Eliminazione % di ocratossina nel ratto pretrattato con IgG anti-ocratossina incorporata in chitosano, ed intossicato successivamente con ocratossina.

Tempo dall'intossicazione ore	Eliminazione % di tossina ematica
3	60
6	100
9	100

I dati riportati in tabella indicano che, mediante l'utilizzo dei complessi secondo l'invenzione, già dopo 6 ore è completata l'eliminazione di tossina dal circolo.



Verifica dell'attività biologica dei complessi IgG anti-somatostatina incorporata in chitosano o alginato.

L'attività biologica dei complessi di IgG anti-somatostatina è stata misurata mediante analisi delle curve di crescita degli animali trattati con i complessi.

Gli esperimenti sono stati condotti sul ratto in accrescimento del peso corporeo di 80 ± 5 gr suddiviso in gruppi di 10 animali che ricevevano:

Gruppo 1 Controlli, nessun trattamento;

Gruppo 2 Trattati con IgG antisomatostatina incorporata in chitosano nella dose di 100 $\mu\text{g/kg}$ ogni 7 giorni per insondamento gastrico in sospensione di gomma arabica al 2%

Gruppo 3 Trattati con IgG antisomatostatina incorporata in alginato nella dose di 100 $\mu\text{g/kg}$ ogni 7 giorni per insondamento gastrico in sospensione di gomma arabica al 2%.

Tutti e 3 i gruppi di animali ricevevano giornalmente, associati alla dieta, 20 mg/kg di L-arginina più 20 mg/kg di acido DL-aspartico come attivatori esogeni dell'ormone somatotropo (GH); gli animali avevano libero accesso all'acqua.

Ogni 7 giorni per un periodo di 1 mese è stato controllato il peso corporeo dei singoli animali.

In tabella 15 sono riportate le differenze percentuali tra le medie dei pesi degli animali trattati con IgG anti-somatostatina per via orale e gli animali di controllo.



Tabella 15. Differenze percentuali tra le medie dei pesi degli animali trattati con IgG anti-somatostatina per via orale ed animali di controllo.

Gruppo	Trattamento	% peso corporeo ai giorni:				
		0	7	14	21	28
1	Veicolo (controlli)	-	-	-	-	-
2	IgG anti-somatostatina in chitosano	-	+2	+9.0	+13.8	+24.5
3	IgG anti-somatostatina in alginato	-	+4	+8.5	+12.7	+23.6

I dati riportati in tabella indicano che i complessi contenenti Ig anti-somatostatina sono in grado di antagonizzare il rilascio endogeno di somatostatina conseguente all'induzione di Growth Hormon mediante somministrazione di L-arginina ed acido DL-aspartico. Il risultato netto è un incremento della crescita indotto dal solo uso di attivatori nutrizionali.

Verifica dell'attività biologica dei complessi IgG anti-protrombina incorporata in chitosano o alginato.

L'effetto della somministrazione di IgG anti-protrombina incorporate in chitosano o alginati sull'attività coagulante è stato misurato in topo mediante il saggio di coagulazione sulla coda.

Topi swiss del peso di 20 gr, di ambo i sessi, venivano suddivisi in gruppi di 10 animali e trattati nel seguente modo:

Gruppo 1: Controlli, ricevevano per via orale 0.5 ml di una soluzione di gomma arabica al 2%;

Gruppo 2: Trattati, ricevevano per via orale (insondamento) 5 mg/kg di IgG anti-protrombina incorporate in chitosano risospeso in gomma arabica al 2%.

Gruppo 3: Trattati, ricevevano per via orale (insondamento) 5 mg/kg di IgG anti-protrombina incorporate in alginato, risospeso in gomma arabica al 2%.

Dopo 2 ore gli animali appartenenti ai tre gruppi venivano trattati mediante iniezione sottocutanea di 0.3 ml di una soluzione al 3% di calcio cloruro.

Alla terza ora agli animali veniva recisa con una lametta la parte terminale della coda che veniva poi immersa in un bagno di soluzione fisiologica termoregolato a 37°C.

Venivano controllati i tempi di gocciolamento del sangue (cessato gocciolamento) come indice di produzione endogena di trombina e quindi di attivazione della cascata coagulativa.

La differenza percentuale di allungamento dei tempi di gocciolamento degli animali trattati con i complessi di IgG anti-protrombina in polisaccaridi, somministrati per insondamento gastrico, rispetto ai controlli, sono riportati in tabella 16; questi dimostrano che le IgG anti-protrombina somministrate nelle modalità sperimentali descritte, sono in grado di ridurre la biodisponibilità del precursore fisiologico della trombina.

Tabella 16. Effetto dei complessi di IgG antiprotrombina.

Gruppo	Trattamento	Variazione % dei tempi di gocciolamento della coda di topo
1	Controlli	-
2	Trattati con IgG anti-protrombina in chitosano per os	+ 17.5%
3	Trattati con IgG anti-protrombina in alginati per os	+ 15.0 %

Verifica dell'attività biologica dei complessi IgG anti-gonadotropina corionica incorporata in chitosano o alginato.

L'analisi degli effetti della somministrazione di IgG anti-gonadotropina corionica in chitosano o alginato è stata effettuata valutando l'induzione della gravidanza nel ratto.

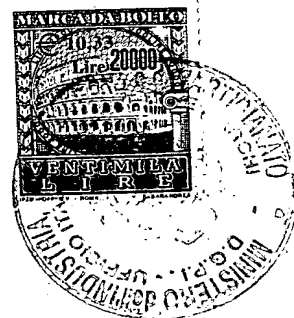
Gli esperimenti sono stati condotti su ratti Wistar femmine, dal peso di $200 \text{ g} \pm 10$, suddivisi in gruppi da 50 animali e trattati nel seguente modo:

Gruppo 1: controlli, nessun trattamento.

Gruppo 2: Trattati con IgG anti-gonadotropina corionica incorporata in chitosano.

Gruppo 3: Trattati con IgG anti-gonadotropina corionica incorporata in alginati.

Gli animali ricevettero ogni 4 giorni tutto il periodo dell'accoppiamento, una dose dei complessi secondo l'invenzione, corrispondente a 10



mg/kg di IgG per insondamento gastrico in sospensione di gomma arabica al 2%.

Le femmine furono mantenute in gabbie in numero di 5 animali per gabbia, con libero accesso a cibo ed acqua, ed in ogni gabbia veniva aggiunto un animale maschio sessualmente maturo (ratto Wistar maschio dal peso di 250 gr.); questi veniva mantenuto nella gabbia 20 giorni dall'inizio dell'esperimento.

Al termine di tale periodo il ratto maschio veniva allontanato e le femmine trasferite in gabbia per singolo animale; il trattamento con IgG anti-gonadotropina corionica veniva sospeso.

Sulle femmine venne controllato successivamente il numero delle gravidanze (parti).

In tabella 17 è riportata la riduzione percentuale del numero di gravidanze degli animali trattati con i complessi contenenti IgG anti-gonadotropina corionica, per insondamento gastrico, rispetto ai controlli.

Tabella 17. % di riduzione delle gravidanze

Gruppo	Trattamento	Riduzione % delle gravidanze
1	Controlli	-
2	Trattati con IgG anti-gonadotropina corionica in chitosano	85 %
3	Trattati con IgG anti-gonadotropina corionica in alginato	78 %

I dati riportati in tabella 17 indicano che il trattamento con i complessi secondo l'invenzione contenenti IgG anti-ChG riducono significativamente il numero delle gravidanze nel modello animale utilizzato, sia per i complessi in alginato che per quelli in chitosano.

Verifica dell'attività biologica dei complessi IgG anti-cocaina incorporata in chitosano o alginato.

L'analisi degli effetti della somministrazione di IgG anti-cocaina in chitosano o alginati sulla risposta anestetica della cocaina è stata effettuata sul modello murino mediante il test della piastra calda in accordo con quanto descritto da O. Bagasra et al. (Immunopharmacology, 1992, 23:173).

Topi Swiss dal peso di 20 gr., maschi, suddivisi in gruppi di 20 animali così trattati:

Gruppo 1: Controlli, gli animali ricevevano per insondamento gastrico 0.5 ml di gomma arabica al 2%.

Gruppo 2: Trattati con IgG anti-cocaina incorporate in chitosano.

Gruppo 3: Trattati con IgG anti-cocaina incorporate in alginati.

Gli animali ricevevano per insondamento gastrico una dose di complessi secondo l'invenzione corrispondente a 20 mg/kg di IgG risospesi in 0.5 ml di gomma arabica al 2%.

Dopo 3 ore tutti gli animali ricevevano per via intraperitoneale 25 mg/kg di cocaina in soluzione fisiologica.

Dopo un'ora gli animali venivano posti su una piastra termoregolata a 55°C, controllando in secondi il tempo di reattività dell'animale allo

stimolo termico.

In tabella 18 sono riportate le variazioni percentuali delle risposte rispetto agli animali di controllo che hanno ricevuto solo cocaina.

Gruppo	Trattamento	Riduzione % dei tempi di risposta allo stimolo termico
1	Controlli	-
2	pretrattati con IgG anti-cocaina in chitosano per os	50.0 %
3	pretrattati con IgG anti-cocaina in alginati per os	46.0 %

I dati in tabella indicano che i complessi secondo l'invenzione, forniti per os, e contenenti gli anticorpi anti-cocaina, esplicano la loro funzione sequestrando la cocaina dal circolo. L'effetto misurato è quindi la riduzione dei tempi di reazione allo stimolo rispetto agli animali trattati sono con cocaina.

Verifica dell'attività biologica dei complessi IgG anti-Salmonella incorporata in chitosano o alginato associati o meno a BVV.

L'analisi degli effetti della somministrazione di IgG anti-Salmonella in chitosano o alginati in associazione o meno a BVV nella prevenzione dello sviluppo clinico di salmonellosi è stata effettuata nel topo.

Gli esperimenti furono condotti su gruppi di 20 topi Swiss dal peso di 20 gr., così trattati:

Gruppo 1: Controlli: animali alimentati normalmente.

Gruppo 2: Trattati con IgG anti-Salmonella incorporate in chitosano ai giorni 0, 7 e 14.

Gruppo 3: Trattati con IgG anti-Salmonella incorporate in chitosano, associate ai complessi contenenti la frazione particellare BVV incorporata in chitosano alla dose di 2 mg/kg, sempre risospesi nella stessa sospensione di gomma arabica al 2%.

Gli animali ricevevano per insondamento gastrico una dose di complessi secondo l'invenzione corrispondente a 5 mg/kg di IgG risospesi in 0.5 ml di gomma arabica al 2%.

Al 15° giorno gli animali venivano inoculati per via orale con una dose di *Salmonella enteritidis* corrispondente a 10^9 microorganismi. Gli animali venivano quindi divisi e mantenuti singolarmente in gabbie, controllando l'insorgenza di episodi clinici di salmonellosi.

In tabella 19 sono riportate le percentuali degli animali che hanno sviluppato la salmonellosi nei tre gruppi.

Gruppo	Trattamento	% infezioni cliniche
1	Controlli	85
2	pretrattati con IgG anti-Salmonella in chitosano per os	20
3	pretrattati con IgG anti-Salmonella in chitosano in associazione con BVV in chitosano	0



I dati in tabella 19 evidenziano che la vaccinazione passiva con IgG anti-Salmonella in chitosano per os è sufficiente a prevenire significativamente l'insorgenza dell'infezione sperimentale.

Tale attività è potenziata dalla contemporanea somministrazione dei complessi contenenti immunomodulante aspecifico (BVV) somministrato nella stessa forma e nelle stesse modalità degli anticorpi anti-Salmonella.

RIVENDICAZIONI

1. Complessi di immunoglobuline e polisaccaridi per uso farmaceutico.
2. Complessi secondo la rivendicazione 1 dove tali polisaccaridi sono scelti tra: chitosano, chitosano di basso peso molecolare ed alto grado di deacetilazione, metilglucolchitosano, acido alginico, acido polimannuronico e loro sali o derivati.
3. Complessi secondo la rivendicazione 2 dove tali polisaccaridi non sono reticolati chimicamente.
4. Complessi secondo la rivendicazione 2 dove tali immunoglobuline sono scelte tra IgG, IgA, o loro frammenti $F(ab')_2$ o $F(ab)$.
5. Complessi secondo la rivendicazione 4 dove tali immunoglobuline sono IgG o loro frammenti $F(ab')_2$ o $F(ab)$.
6. Complessi secondo la rivendicazione 1 dove le immunoglobuline ed i polisaccaridi sono associati mediante legami non-covalenti.
7. Complessi secondo la rivendicazione 6 dove le immunoglobuline ed i polisaccaridi sono associati mediante interazioni ioniche.
8. Complessi secondo le rivendicazioni 4 e 5 dove tali immunoglobuline sono specifiche per tossine, agenti infettivi, ormoni, enzimi e proenzimi, sostanze stupefacenti, farmaci, peptidi bioattivi, metaboliti, precursori fisiologici.
9. Complessi secondo la rivendicazione 8 dove tali tossine sono di origine micotica e sono presenti in sostanze per uso alimentare
10. Complessi secondo la rivendicazione 9 dove tali tossine sono scelte tra: ocratossina, aflatossina, zearalonone e fumonisina.
11. Complessi secondo la rivendicazione 8 dove tali agenti infettivi sono



scelti tra: virus Herpes simplex, citomegalovirus (CMV), virus della varicella, virus della rosolia, virus sinciziale, virus respiratorio, virus dell'influenza, virus di Epstein-Barr, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thiphy*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella thiphymurium*, *Salmonella cholerae*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* o *Shigella*, *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii* o per loro componenti antigeniche

12. Complessi secondo la rivendicazione 8 dove tali ormoni sono: gonadotropina corionica, paratormone, glucagone, ormone tiroideo.

13. Complessi secondo la rivendicazione 8 dove tale proenzima è la protrombina.

14. Complessi secondo la rivendicazione 8 dove tali sostanze stupefacenti sono la cocaina, l'eroina, l'acido lisergico o i loro derivati

15. Complessi secondo la rivendicazione 8 dove tali peptidi bioattivi sono: somatostatina, colecistochinina, calcitonina, pentagastrina.

16. Complessi secondo la rivendicazione 8 dove tali farmaci sono monensina, corticosteroidi, antibiotici, anticoccidiostatici, antivirali, fungicidi, chemioterapici, simpatico-mimetici.

17. Complessi secondo le rivendicazioni 1-16 per uso orale, transmucosale.

18. Complessi secondo la rivendicazione 17 dove tale uso transmucosale è perilinguare, rettale, vaginale.

19. Uso dei complessi secondo le rivendicazioni 9-10 e 16 per la preparazione di farmaci detossificanti.

20. Uso dei complessi secondo la rivendicazione 14 per la preparazione di farmaci per il trattamento della sindrome da sovradosaggio da sostanze stupefacenti.
21. Uso dei complessi secondo la rivendicazione 15 per la preparazione di farmaci per il trattamento dei problemi legati all'accrescimento, per il trattamento dell'osteoporosi, anti-ulcera.
22. Uso dei complessi secondo la rivendicazione 16 per la preparazione di additivi alimentari.
23. Uso dei complessi secondo la rivendicazione 19 per uso zootecnico
24. Composizioni contenenti quali principio attivo i complessi in accordo con le rivendicazioni 1-16 in combinazione con opportuni adiuvanti e/o eccipienti.
25. Composizioni secondo la rivendicazione 22 per uso orale e/o trans-mucosale.
26. Composizioni secondo la rivendicazione 22 dove tali adiuvanti sono immunomodulatori aspecifici derivati da *Corynebacterium granulosum*.
27. Composizioni secondo la rivendicazione 26 dove tali immunomodulatori aspecifici sono la frazione delipidata di *Corynebacterium granulosum*.
28. Procedimento per la preparazione dei complessi di cui alle rivendicazioni 1-17.

(SM/lm)



Handwritten signature or initials.

Milano, li 21 febbraio 2001

p. GRISOTECH S.A.

Il Mandatario


Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

